

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 3: A61K 35/78; C07G 17/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 82/01130 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1982 (15.04.82)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP81/00159		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BR, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK, HU, FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.	
(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Oktober 1981 (07.10.81)			
(31) Prioritätsaktenzeichen: A 4971/80			
(32) Prioritätsdatum: 7. October 1980 (07.10.80)			
(33) Prioritätsland: AT		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht</i>	
(71) Anmelder: und (72) Erfinder: KEPLINGER, Klaus [AT/AT]; Müllerstrasse 30, A-6020 Innsbruck (AT).			
(74) Anwälte: TORGGLER, Paul etc.; Wilhelm-Greil-Str. 16, A-6020 Innsbruck (AT).			

(54) Title: COMPOSITION ALLOWING FOR MODIFYING THE GROWTH OF LIVING CELLS, PREPARATION AND UTILIZATION OF SUCH A COMPOSITION

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEEINFLUSSUNG LEBENDER ZELLEN, VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG SOWIE DESSEN ANWENDUNGEN

(57) Abstract

New cytostatic, contraceptive and anti-inflammatory compositions contain an active compound, obtainable for example from an extract, with a low content of tannin, prepared from *Uncaria tomentosa* (Willd.) at the stage of fresh fiber of yellow brown colour. The active compound produces an inhibition of the utilization of ^3H -thymidine by the sarcome-ascites cells of the mouse according to Weitzel et al; this inhibition being at least of the same degree of magnitude than that of the active compound methotrexatR, used as a standard substance in this test.

(57) Zusammenfassung

Neue zytostatische, kontrazeptive und entzündungshemmende Mittel enthalten einen Wirkstoff, der beispielsweise aus einem zumindest weitgehend gerbstofffreien Extrakt der *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. mit gelbbrauner Färbung des frischen Bastes gewinnbar ist. Der Wirkstoff bewirkt im ^3H -Thymidin-Einbautest in Ascites-Sarkomzellen der Maus nach Weitzel et al eine Einbauhemmung, die zumindest so groß ist wie die der Standardtestsubstanz MethotrexatR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KP	Demokratische Volksrepublik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BR	Brasilien	LU	Luxemburg
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MC	Monaco
CG	Kongo	MG	Madagaskar
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumania
FI	Finnland	SE	Schweden
FR	Frankreich	SN	Senegal
GA	Gabun	SU	Soviet Union
GB	Vereinigtes Königreich	TD	Tschad
HU	Ungarn	TG	Togo
JP	Japan	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Mittel zur Beeinflussung lebender Zellen, Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Anwendungen.

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Beeinflussung lebender Zellen, Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Anwendungen.

Unter der Beeinflussung lebender Zellen wird hier insbesondere die Behinderung von lebenden Zellen verstanden, die einen Organismus gefährden können. Hierzu zählen vor allem Tumorzellen, die ihrem im Organismus zugeteilten Aufgaben nicht mehr gerecht werden können. Zur Beeinflussung derartiger Tumorzellen werden unter anderem auch Zytostatika verwendet, die neben der gewünschten Wirkung auf die Tumorzellen auch unerwünschte Beeinflussungen auf gesunde Zellen ausüben, sodaß trotz einer Vielzahl von bekannten, aus natürlichen Vorkommen oder synthetisch hergestellten Stoffen eine der vorrangigen Aufgaben der pharmazeutischen Industrie darin liegt, weitere Mittel zu entwickeln.

Eine bei der Voruntersuchung eventuell für die positive Beeinflussung lebender Zellen geeigneter Wirkstoffe allgemein übliche Testmethode prüft in vitro den Einbau von ^3H -Thymidin (Thymidylsäure) in Ascites-Sarkomzellen von Ratten und Mäusen, wie sie von Weitzel et al beschrieben wird (Hoppe und Seyler's Zeitschrift der physiologischen Chemie 348, 433, 1967). Thymidin ist ein Zellkernbestandteil und z. B. in den Ascites-Sarkomzellen in weit größerem Ausmaß enthalten als in Normalzellen. Werden transformierte Zellen mit Thymidin inkubiert, so wird dieses in die Zellen eingebaut, und die Wirksamkeit des zu untersuchenden Mittels an Hand der Hemmung des Thymidineinbaus geprüft. Da die Einbaurate auch zellabhängig ist, wurden Standardpräparate geschaffen, die zum Vergleich herangezogen werden können, beispielsweise ein Präparat aus 4-Amino- ^{10}N -methyl-pteroylglutaminsäure, das unter dem Handelsnamen Methotrexat ^(R) (Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Co., New York) erhältlich ist, und eine zufriedenstellende Hemmung des Thymidineinbaus bewirkt.

Wie bereits erwähnt, stellt die Untersuchung der Thy-



- 2 -

midineinbaurate nur einen der ersten Schritte bei der Beurteilung für die Applikation eines Wirkstoffes dar, dem eine Reihe weiterer Untersuchungen folgen müssen. Es hat sich leider gezeigt, daß eine Vielzahl von Wirkstoffen, 5 die im Thymidineinbautest eine große Inhibierungsrate bewirken, aus anderen Gründen (Toxizität, Schädigung des Immunsystems des Organismus, etc.) nicht zur gewünschten Beeinflussung der Zellen herangezogen werden können. Dies gilt beispielsweise, wie bekannt, für verschiedene Gerbstoffe, 10 die im Thymidineinbautest zufriedenstellend abschneiden.

Die Erfindung schlägt nun ein weiteres Mittel vor, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es einen Wirkstoff enthält, der beispielsweise aus einem zumindest weitgehend 15 gerbstofffreien Extrakt der *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. aus der Ordnung der Gentianales, mit gelbbrauner Färbung des frischen Bastes, die im politischen Bezirk Chanchamayo, Peru, vorkommt, erhältlich ist, und der im 3 H-Thymidineinbautest in Ascites-Sarkomzellen der Maus nach Weitzel 20 et al eine Einbauhemmung des 3 H-Thymidins bewirkt, die zumindest halb so groß ist wie die Einbauhemmung durch Methotrexat \textcircled{R} .

Die beispielsweise zur Herstellung des Wirkstoffes geeignete *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. gehört in die Familie der Rubiaceen und diese in die Ordnung der Gentianales. Bekannte Inhaltsstoffe sind iridoidartige Verbindungen, Indol-Alkaloide, Bitterstoffe, herzwirksame Glykoside (Steroide), Kaffeesäure. Eine kurze systematische Übersicht mag die Verwandtschaftsverhältnisse veranschaulichen:

30 Ordnung Gentianales:

- a) Loganiaceae mit Strychnos (Indolalkaloide)
- b) Buddlejaceae
- c) Rubiaceae
- d) (Naucleaceae)



- 3 -

Familie Rubiaceae

Über die Systematik der Familie gibt es noch sehr divergierende Ansichten. Die Gattung *Uncaria* ist nach VERDCOURT B. 1958 der Unterfamilie Rubioideae zuzurechnen.

5 Gattung *Uncaria*

Die Gattung umfaßt ca. 60 Arten, die im tropischen Amerika, Afrika und Asien vorkommen. Verbreitungsschwerpunkt ist der südostasiatische Raum und Indonesien bis Neu Guinea - Australien.

10 Art *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC.

Diese Art kommt in mehreren Unterarten hauptsächlich in Zentralamerika und westlichem Südamerika von Guatemala bis Peru vor, die sich in der Färbung des frischen Bastes voneinander unterscheiden. Bisher wurden Unterarten mit gelbbrauner und mit dunkelroter Bastfärbung näher untersucht, die am Ostabhang der Anden im politischen Bezirk Chanchamayo, Peru, im Nebelwald der leicht gebirgigen Landschaft der Flüsse Rio Chanchamayo und Rio Perené in einer Seehöhe von 500 - 1200 m wächst. Eine *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. mit gelbbrauner Färbung des frischen Bastes ist im Herbarium des Institutes für Botanik der Universität Graz, Österreich (G. Z.U.) enthalten. Die Untersuchung einer weiteren Unterart mit heller Bastfärbung ist noch im Gange.

Bei erfindungsgemäßen Mitteln konnten verschiedene Wirkungen festgestellt werden, die nicht ohne weiteres in einen erklärbaren Zusammenhang gebracht werden können:

1. Beeinflussung von Tumorzellen
2. kontrazeptive Wirkung
3. Entzündungshemmung

Ein Zusammenhang dieser unterschiedlichen Wirkungsweisen könnte dann gesehen werden, wenn Tumorzellen, Keimzellen und entzündete Zellen als undifferenzierte Zellen betrachtet werden, also als Zellen, die eine definierte, zugeordnete Aufgabe im Organismus noch nicht besitzen (Keimzellen), nicht mehr besitzen (Tumorzellen),



- 4 -

zellen) oder vorübergehend nicht besitzen (entzündete Zellen). Die Gemeinsamkeit der Wirkungsweisen liegt demzufolge möglicherweise darin, daß die genannten undifferenzierten Zellen in ihrem Wachstum bzw. ihrer Teilung zumindest be-
5 hindert werden.

Es ist zu vermuten, daß die erfindungsgemäßen Mittel in der Lage sind, geschwächte Wasserstoffbindungen in der Desoxyribonucleinsäure zwischen Purinen und Pyrimidinen zu festigen, und so über das rediculo-endotheliale System die 10 mitose Teilung der Zellen zu inhibieren, bzw. die Produktion von Enzymen zu korrigieren, sowie die Reifeteilung von Keimzellen zu behindern.

Folgende Untersuchungen über die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Mittel wurden durchgeführt:

15 I. Die Toxizität

Oral liegt die mittlere lethale Toxizität für Mäuse bei einem Wert größer als 16 g/kg Körpergewicht. Intrapereitoneal sind 300 mg/kg noch unbedenklich, 1000 mg/kg führen nach 17 - 24 Stunden, 3000 mg/kg nach 4 - 16 Stunden zum 20 Tod. Intravenös liegt die Toxizitätsgrenze bei 400 mg/kg Körpergewicht.

II. Die antiinflammatorische Wirkung

1. Die Wirkung wurde bei Mäusen an einem Carragenin-Pfoten-Ödem ausgetestet. Als Vergleichssubstanz wurde Indometazin 25 verwendet. Die Gabe der Testsubstanzen erfolgte eine Stunde vorder Gabe von Carragenin.

Erfindungsgem.
Präparat

Entzündungshemmung
Indometazin Entzündungs-
hemmung

30 i.p. 10 mg/kg

47 %

i.p. 3 mg/kg 34 %

BU-
CPI
WZL

- 5 -

Erfindungsgem. Entzündungshemmung Präparat		Indometazin	Entzündungs- hemmung
i.p. 100 mg/kg	49 %	i.p. 9 mg/kg	43 %
p.o. 1 mg/kg	0 %		
5 2 mg/kg	16 %		
3 mg/kg	33 %		
10 mg/kg	38 %		
100 mg/kg	42 %		

10 In der Dosierung von 200 mg täglich wurde über drei Wochen ein erfindungsgemäßes Mittel in wässriger Lösung oral an zwei Patienten mit Gastritis verabreicht. Schon nach drei Tagen waren alle subjektiven Beschwerden beseitigt, die objektiven Befunde normalisierten sich im Behandlungsräum. Die gleiche Therapie führte bei einem Patienten mit 15 Ulcus duodeni zum gleichen Ergebnis.

Im rheumatoiden Formenkreis sind zwei Fälle über kurze Zeit mit guten Erfolgen behandelt worden, doch konnte diese Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

III. Orientierende Untersuchung über kontrazeptive Wirkung

20 Je fünf weibliche Mäuse bekamen p. o. täglich 25 mg/kg und 6,25 mg/kg erfindungsgemäßes Präparat in wässriger Lösung. In einen Teil der Käfige wurde am 2. Tag eine männliche Maus eingesetzt, in den anderen Teil am 9. Tag. In den Käfigen mit der Dosierung 25 mg/kg und 6,25 mg/kg gab 25 es keine Jungen.

IV. Beeinflussung transformierter Zellen

1. Menschliche diploide Fibroblasten - Hela-Zellen

Menschliche diploide Fibroblasten von Hautbiopsien und etablierte Hela-Zellen wurden unter Standard-Kulturbedin-



- 6 -

gungen (MEM, 10 % fetal calf serum) gezogen. Zusatz von 0,4 g/ml erfindungsgemäßem Präparat zum Wuchsmedium hatte keine bzw. kaum morphologische Veränderungen an Fibroblasten zur Folge. Hela-Zellen rundeten sich nach dem Umsetzen 5 ab, wurden blasig, lösten sich von der Platte ab. Dieser Vergleich menschlicher untransformierter Fibroblasten und Hela-Zellen wurde verschiedene Male mit wechselnden Konzentrationen von erfindungsgemäßem Präparat durchgeführt. Qua-10 litativ war das Ergebnis immer wie oben beschrieben. Diese Experimente wurden auch fotografisch dokumentiert.

2. 3T3 - SV 3T3

Im ersten Experiment waren zwei menschliche Zellen verglichen worden, von denen eine Linie Fibroblasten waren, die andere Linie (Hela) aber aus einem Cervix-Carcinom 15 stammte. Um möglichst nichttransformierte und transformierte Zellen gleichen Ursprungs zu vergleichen, wurden 3T3-Zellen und mit SV 40 transformierte 3T3-Zellen gezogen und parallel mit erfindungsgemäßem Präparat behandelt. Das Ergebnis war ähnlich wie im ersten Experiment-Typ. 3T3-Zellen werden we-20 sentlich weniger geschädigt als SV 3T3-Zellen. Es ist jedoch bemerkenswert, daß 3T3-Zellen von erfindungsgemäßem Präparat stärker beeinflußt werden als primäre Fibroblastenkulturen. Die Ursache könnte darin liegen, daß 3T3 eine permanente Zelllinie ist.

25 In allen Versuchsreihen, die zwischen Jänner 1978 und Oktober 1978 durchgeführt wurden, zeigte sich deutlich, daß transformierte Zellen von erfindungsgemäßem Präparat mehr geschädigt wurden als nichttransformierte Zellen.

30 Im Zuge dieser oben beschriebenen Testreihen hat sich gezeigt, daß auch transformierte Zellen unter dem Einfluß von erfindungsgemäßem Präparat nicht ganz absterben, son-
dern ihre Mitoserate von etwa 70/1000 auf etwa 12/1000 sinkt. So behandelte transformierte Zellen wurden anschließend auf

BUREAU
OMPI
WIPO

- 7 -

einen harten Nährboden gesetzt, wo sie - wie nichttransfor-
mierte Zellen - absterben, während unbehandelte transfor-
mierte Zellen auf einem harten Nährboden allgemein nicht
absterben.

5 3. 3 H-Thymidineinbautest in Ascites-Sarkomzellen von Ratten
nach Weitzel et al

Es wurden folgende Thymidineinbautests durchgeführt,
wofür

a) ein alkoholischer Gesamtextrakt aus Wurzeln einer er-
10 sten Pflanze der Unterart Uncaria tomentosa mit gelbbrauner
Färbung des frischen Bastes,

b) ein Extrakt aus Wurzeln der ersten Pflanze der Unterart
Uncaria tomentosa mit gelbbrauner Färbung des frischen Ba-
stes, dem durch eine basische Bleiacetatfällung die Haupt-
15 menge an polymeren Catechingerbstoffen entzogen worden wa-
ren,

c) ein zweiter alkoholischer Gesamtextrakt aus Wurzeln
einer zweiten Pflanze der Unterart Uncaria tomentosa mit
gelbbrauner Färbung des frischen Bastes,

20 d) ein Äthylacetat-Macerat aus Wurzeln einer zweiten
Pflanze der Unterart Uncaria tomentosa mit gelbbrauner Fär-
bung des frischen Bastes,

e) ein alkoholischer Gesamtextrakt aus Wurzeln einer
Pflanze der Unterart Uncaria tomentosa mit dunkelroter Fär-
25 bung des frischen Bastes, und

f) ein Äthylacetat-Macerat aus Wurzeln einer Pflanze der
Unterart Uncaria tomentosa mit dunkelroter Färbung des fri-
schen Bastes



verwendet wurden. Vergleichstests wurden mit dem erwähnten Methotrexat ^R durchgeführt.

Herstellung von Zellsuspensionen:

Die Transplantation von Walker-256-Carcinosarkom er-
 5 folgt in Abständen von 3 - 4 Tagen auf männliche oder weib-
 liche ca. 200 g schwere Wistaratten durch Implantation von
 0,2 ml Nativascites. Einer Ratte mit starker Ascitesbildung
 (Implantation 4 Tage zuvor) wurde, nachdem sie mit Chlоро-
 10 form betäubt worden war, der Ascites aus der nicht geöff-
 neten Peritonealhöhle abpunktiert. Die Asciteszellsuspen-
 sion wurde bei 4° C 10 Min. u. 1000 upm zentrifugiert und
 der Niederschlag abdekantiert. Der Zellniederschlag wurde
 in Medium L-15 (Hersteller Fa. Boehringer, Mannheim) resus-
 pendiert, unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifu-
 15 giert, der Überstand abdekantiert und mit Medium L-15 so-
 weit verdünnt, daß die Zellsuspension $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml
 enthielt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer
 Neubauer'schen Zählkammer.

In vitro-Bestimmung der Hemmung der DNS-Synthese: Die
 20 Inkubation der Zellsuspension mit ³H-Thymidin erfolgte
 nach Weitzel und Mitarb. Ein Inkubationsansatz enthielt:

1 ml Zellsuspension des Walker-256-Carcionosarkom-
 Ascites ($1,5 \times 10^6$ Zellen), 1 mg Substanz in 0,5 ml phys.
 25 NaCl-Lsg. mit Ultraschall suspendiert und 0,1 ml ³H-Thy-
 midin (spez. Akt. 50,8 Ci/m Mol) entsprechend 1 μ Ci.

Die Kontrolle enthielt 1,0 ml Zellsuspension, 0,5 ml
 Medium L-15 und 0,1 ml (1μ Ci) radioaktiven Präkursor.

Pro Ansatz wurden vier bis sieben Proben inkubiert.
 Die Zellsuspension wurde zwei Stdn. bei 37° C im Schüttel-
 30 bad mit den in physiologischer Kochsalzlösung unter Ul-
 trabeschallung suspendierten Substanzen vorinkubiert. An-
 schließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem

BUREAU
 CEMPI
 WHO

- 9 -

Präkursor.

Nach dieser Zeit wurde der Einbau gestoppt, indem der Ansatz mit 1,0 ml eiskalter NHClO_4 versetzt wurde. Dadurch erfolgte die Lyse der Zellen und Fällung der säureunlöslichen Fraktion. Man ließ den Ansatz über Nacht stehen. Die Niederschläge, die die eingebauten Präkursoren enthielten, wurden anschließend durch Glasfaserfilter ($\varnothing = 25 \text{ mm}$) abgesaugt, 2 mal mit eiskalter 1 NHClO_4 -Lösung und einmal mit Äthanol gewaschen. Die Filter mit dem Niederschlag wurden in Polyäthylenfläschchen gebracht und die Aktivitäten im Toluol-Scintillator gemessen. Die Scintillationslösung enthielt pro Liter: 50 ml Liquifluor, 400 ml Triton X-100 [®] und 550 ml Toluol p.a.. ^3H -Thymidin-Liquidfluor, Triton X-100 [®] wurden von der Fa. NEN-Chemicals, Dreieichenhain, BRD, bezogen. Die Ergebnisse wurden gegen die Kontrolle verglichen und die Hemmeffekte in % ausgedrückt.

Das Ergebnis ist in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

getestete Substanz	Färbung des frischen Bastes	Inhibierung der ^3H -Thymidin-Einbaurate (Mittelwert)
20 a (mit Gerbstoffen)	gelbbraun	52,5 %
b (weitgehend gerbstofffrei)	gelbbraun	59,3 %
Methotrexat [®]		45 %
25 c (mit Gerbstoffen)	gelbbraun	81,2 %
d (weitgehend gerbstofffrei)	gelbbraun	80,1 %
Methotrexat [®]		73,3 %
30 e (mit Gerbstoffen)	dunkelrot	47 %



- 10 -

getestete Substanz	Färbung des frischen Bastes	Inhibierung der ³ H-Thymidin-Einbaurate (Mittelwert)
stoffen)		
5 f (weitgehend gerbstofffrei)	dunkelrot	64,7 %
Methotrexat [®]		73,3 %

Aus vorstehender Tabelle ergibt sich, daß die Einbaurhemmung der Extrakte aus Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. 10 mit gelbbrauner Bastfärbung jeweils der von Methotrexat überlegen waren und über der von Extrakten aus Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. mit dunkelroter Bastfärbung liegt. Letzteres beruht darin, daß Uncaria tomentosa mit dunkelroter Bastfärbung den Wirkstoff in geringerer Konzentration enthält. Weiters ist daraus ersichtlich, daß die Wirkung der erfindungsgemäßen Mittel nicht auf den Gerbstoffen beruht, die, wie erwähnt, ebenfalls eine zufriedstellende Einbaurhemmung bewirken, sondern daß der Wirkstoff 15 in dem zumindest weitgehend gerbstofffreien Extrakt enthalten ist.

4. Eine Reihe von Patienten wurden in der Dosierung von 200 mg täglich oral in wässriger Lösung mit einem erfindungsgemäßen Mittel über verschieden lange Zeiträume behandelt, wobei die normale Therapie (Bestrahlungen, Zytostatika) unverändert weitergeführt wurde. Es handelte sich 25 um folgende Erkrankungen jeweils in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium: Melanom, Osteosarcom, Collumcarcinom, Mammacarcinom, Hodgkin, Erythroleukämie. In allen Fällen hat sich gezeigt, daß während der Behandlung mit erfindungsgemäßem Präparat Zytostatica wesentlich besser vertragen wurden. Teilweise konnte mit der Dosierung in die Höhe gegangen werden, immer waren die Erholungsphasen um wesentliches kürzer. Bei der Erythroleukämie konnte auf

BUKRAU

- 11 -

Bluttransfusionen über lange Zeiträume überhaupt verzichtet werden.

Einige Werte des Melanom-Patienten zur Verdeutlichung:
Quantitative Immunglobulinbestimmung

5 vor der Behandlung mit erfundungsgemäßem Präparat nach 8 Monaten

IgG	1.280 mg%	2000 mg%
IgA	82 mg%	174 mg%
IgM	186 mg%	288 mg%

10 Durchschnittliche Blutbefunde

vor der Behandlung mit erfundungsgemäßem Präparat	während der Behandlung mit erfundungsgemäßem Präparat
---	---

Leukozyten	3.060	4.350
Thrombozyten	90.800	92.300
15 Hb	12,7	13,5

5. Wirkung bei gesunden Testpersonen

Die Testgruppe bestand aus 7 Personen (6 männlich, 1 weiblich). Verabreicht wurde ein erfundungsgemäßes Präparat in wässriger Lösung oral, 200 mg täglich am Morgen vor dem Frühstück. Als Parameter wurden herangezogen: ICT, Ery, Leuko, Thr, Hb, Hk, Sgot, Sgpt, Gamma-Gt, Cholinesterase, Alk. Phosphatase mU/ml Bili mg%, Neutralfett mg%, Harnsäure, Kreatinin, Harnstoff, Kalium, Ca, Na, Chloride, GE.

Am subjektiven Befinden der Testpersonen hat sich während des Behandlungszeitraumes konkret nichts geändert. Ei-

BU
CWIPI
WIPO

- 12 -

nige Parameter zeigten aber doch eine bemerkenswerte Veränderung:

vor dem Test

am Ende des Testes

SGOT	1	45	11
	2	19	6
	3	21	17
	4	8	11
	5	kein Wert	18
	6	6	13
	7	11	19
SGPT	1	98	7
	2	33	6
	3	49	3
	4	21	11
	5	kein Wert	5
	6	14	12
	7	23	11
G-GT	1	81	10
	2	66	30
	3	72	18
	4	14	17
	5	kein Wert	45
	6	11	4
	7	62	52
Alka- li-	1	197	22
sche	2	120	22
Phos-	3	98	29
pha-	4	76	38
te	5	kein Wert	kein Wert
	6	131	9
	7	87	16
Harn- säu-	1	7,5	6,5
re	2	8,2	7,7
	3	6,9	5,6
	4	6,4	5,0

- 13 -

vor dem Test

am Ende des Testes

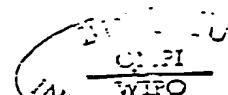
Harn-	5	5,3	kein Wert
säure	6	4,3	3,8
	7	7,0	6,5

5 v. Inhaltsstoffe von Uncaria Arten

1. Amerikanische und afrikanische Uncaria-Arten sind in chemischer Hinsicht noch kaum untersucht worden. Im Hinblick auf zu erwartende Inhaltsstoffe kann man sich daher nur an dem orientieren, was über die südostasiatischen und 10 indonesischen Uncaria-Arten bekannt ist. Auf jeden Fall ist mit den gleichen Stoffgruppen zu rechnen, viele Verbindungen werden auch identisch sein. Sicher ist aber auch die Möglichkeit gegeben, daß bei einzelnen Stoffen beträchtliche Unterschiede zwischen den Arten der Alten und Neuen 15 Welt bestehen. Als ein bekanntes Beispiel dafür darf in diesem Zusammenhang auf die unterschiedliche Wirkung der Indol-Alkaloide von altweltlichen und neuweltlichen Strychnos-Arten hingewiesen werden. Für einen Vergleich mit Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. sind zweifellos auch die von 20 anderen Naucleaceae bzw. Naucleaceae bekannten Stoffe wichtig. In zweiter Linie werden auch bei Rubiaceae mehr oder weniger allgemein verbreitete Stoffgruppen wichtig sein. Schließlich sind die bei den verschiedenen Gentianales-Familien, insbesondere bei den Loganiaceae vorkommenden 25 Stoffklassen, zu berücksichtigen.

Inhaltsstoffe der Uncaria tomentosa (WILLD.) DC.

Verschiedene Extraktionsverfahren aus gemahlener Wurzel und Wurzelrinde einer Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. mit gelbbrauner Färbung des frischen Bastes ergaben nach 30 Entfernung des Extrahens:



- 14 -

Wasserextrakt ... 7,7 Gew.% Trockensubstanz (braunes, lackartiges Produkt)

Athanolextrakt ... 8,5 Gew.% (wie oben)

Chloroformextrakt ... 1,0 Gew.% (gelbe Schmiere)

5 Die nachstehenden Untersuchungen wurden großteils mit Trockensubstanz aus wässrigem oder alkoholischem Extrakt durchgeführt.

a) Gerbstoffe: Ausfällung durch Bleiacetat, Verfärbung durch Eisen-III-Chlorid. Bei einer orientierenden DC-Untersuchung bei der als Fließmittel eine Mischung von 45 %

10 Toluol, 45 % Aceton und 10 % Ameisensäure eingesetzt wurde, kam es zu einer Auftrennung mehrerer Substanzen, jedoch war eine Identifizierung nicht möglich. Da eine Säurebehandlung (HCl) des Wasserextraktes eine Fällung hervorruft, dürfte

15 es sich hier um Catechingerbstoffe, also um hydrolysierbare Gerbstoffe, handeln. Weitere Untersuchungen der Gerbstoffe wurden noch nicht vorgenommen (DC = Dünnschichtchromatographie).

b) Alkaloide: Konnten eindeutig nachgewiesen werden, sowohl

20 chemisch als auch mit Hilfe der DC. Es handelt sich um mehrere Alkaloide, die im UV-256 absorbieren. Ein Alkaloid zeigte im UV-366 blaue Fluoreszenz. Eine Identifizierung der Alkaloide war noch nicht möglich.

c) Saponine: Der Hämolyseversuch verlief negativ. Ein Vorkommen von Saponinen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, weil ja bekanntlich Gerbstoffe die oben angeführte Bestimmung stören.

d) Unbekannte fluoreszierende Substanzen: Sowohl im Wasserextrakt als auch im Alkoholextrakt konnten mehrere grün und

30 blau fluoreszierende Verbindungen (UV-366) gefunden werden. Substanzen mit ähnlichem, dünnschichtchromatographischem Verhalten treten auch nach der Hydrolyse des Wasserextrak-

BAD ORIGINAL

BUREAU
OMPA

- 15 -

tes, mit Salzsäure auf. Beim Behandeln mit Ammoniakdampf wurde bei diesen Substanzen keine Farbänderung beobachtet (Flavonoide daher unwahrscheinlich). Es ist möglich, daß es sich um Phenylpropanderivate handelt oder um Phenol-5-säuren. Eine dieser Substanzen konnte isoliert werden. Sie zeigt grüne Fluoreszenz (UV-366), hat einen Schmelzpunkt von 138°C ($\pm 2^{\circ}$) und dürfte etwa in der Größenordnung von 0,1% vorhanden sein (Gew.% bezogen auf 1 kg Wurzel).

10 e) Kohlehydrate: Im Wasserextrakt wurden geringe Mengen eines Zuckers (wahrscheinlich Glukose) gefunden. Nach der Hydrolyse mit Salzsäure konnten im Hydrolysat größere Mengen dieses Zuckers dünnenschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

15 f) Weitere Substanzen: Nennenswerte Mengen von Stärke, Fetten, fetten Ölen, ätherischen Ölen und Antrhachinonderivaten können nach mikrochemischen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Wie sich auch aus der Tabelle auf den Seiten 9 und 10 ergibt, sind weitgehend gerbstofffreie Extrakte in der Einbauhemmung den Gesamtextrakten zumindest gleichwertig, in zwei Beispielen (b und f) sogar wesentlich überlegen. Zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe, die auf Grund ihrer Nebenwirkungen die Dosierung des Wirkstoffes 25 bei der Applikation von Gesamtextrakten beschränken, wird beispielsweise vorgeschlagen, daß die Teile der Uncaria tomentosa alkalisiert und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Im einzelnen wird dabei bevorzugt die fein gepulverte Droge mit 10 % NH_3 -Lösung an-30 gefeuert und bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde stehengelassen. Nach Zugabe von Äthylacetat (etwa 2 bis 3-fache Menge des Gewichtes der eingesetzten Droge) wird in einem Erlenmeyer-Kolben eine halbe Stunde am Sorvallmixer extrahiert und anschließend dekantiert. Der Drogenrückstand wird mit 35 Äthylacetat gewaschen und nochmals der gleichen Behandlung unterzogen.

BUNDES
PATENT-
UNION
WIPO

Anschließend bleibt der Rückstand noch eine Woche in Äthylacetat-Lösung bei 12°C stehen. Das Filtrat ist noch schwach alkaloidhaltig. Es zeigt das gleiche Alkaloidmuster wie die Sorvallextraktionen. Die drei so erhaltenen Filtrate werden 5 vereinigt. Zur Anreicherung des Wirkstoffes werden die Filtrate im Vakuum zu einem zähflüssigen braunen Konzentrat eingeengt. Die Ausbeute an Rohextrakten beträgt etwa 6 Gew.% der eingesetzten Drogenmenge.

Nach einem weiteren erfindungsgemäßen Vorschlag wird
10 zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe ein
für den Organismus unbedenklicher Spaltpilz eingesetzt,
mit dessen Hilfe bereits die Teile der *Uncaria tomentosa*
selbst oder deren wässriger Extrakt einer fermentativen
Umwandlung unterzogen wird, die zumindest den größten Teil
15 der enthaltenen Gerbstoffe im ersten Fall unlösbar macht
und im zweiten Fall die Gerbstoffe aus dem Extrakt ausfällt.
Vorzugsweise handelt es sich bei dem Spaltpilz um einen Ver-
treter der Gattung *Trichoderma*, der der Gruppe der imper-
fekten Ascomyceten angehört und alle Eigenschaften eines
20 Schimmelpilzes aufweist. Er ist aerob, türkis-blau und hat
eine im wesentlichen flächige Ausbreitung. Das Wachstum des
Spaltpilzes ist gut, unter den klimatischen Bedingungen Mit-
tel- bzw. Südamerikas sind die ausgegrabenen Wurzeln der
Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. in frühestens 2 Tagen durch-
25 schimmelt. Bei Wirkstoffen, die aus mit vom Spaltpilz be-
siedelten Wurzeln der *Uncaria tomentosa* gewonnen wurden,
konnten dünnenschichtchromatographisch einerseits nur mehr ge-
ringe Spuren von Gerbstoffen, und andererseits im UV-366 eine
neue grün fluoreszierende Substanz festgestellt werden, die
30 anstelle einer der oben unter V. 2. d., beschriebenen, blau
fluoreszierenden Substanzen getreten war.

Die fermentative Umwandlung erfolgt vorzugsweise in
saurem Milieu, etwa bei pH 3, der z. B. durch die Zugabe von
verdünnter Zitronensäure erreicht werden kann.

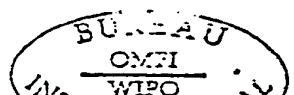
35 Ein weiterer erfindungsgemäßer Vorschlag zur zumindest

- 17 -

weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe besteht darin, daß die Teile der Uncaria tomentosa bei einer Temperatur, die knapp unter der Verkohlungstemperatur des Holzes liegt, vollständig getrocknet und anschließend flüssig extrahiert 5 werden. Dabei gehen die Gerbstoffe nicht mehr in Lösung.

Vorzugsweise erfolgt die Trocknung bei 130° - 150°C während eines Zeitraumes von etwa 45 Minuten.

Der den Wirkstoff enthaltende Extrakt wird gegebenenfalls nach Anreicherung durch Konzentration oder Gefrier-10 trocknung und Wiederlösung in einer physiologisch verträglichen Flüssigkeit, wie Wasser, zu gut verträglichen Arzneimitteln verarbeitet, die eine ausgezeichnete zytostatische, kontrazeptive und antiinflammatorische Wirkung aufweisen.



P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Mittel zur Beeinflussung lebender Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Wirkstoff enthält, der
 - a) beispielsweise aus einem zumindest weitgehend gerbstofffreien Extrakt der Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. aus der Ordnung der Gentianales, mit gelbbrauner Färbung des frischen Bastes, die im politischen Bezirk Chanchamayo, Peru, vorkommt, erhältlich ist, und der
 - b) im 3 H-Thymidineinbautest in Ascites-Sarkomzellen der Maus nach Weitzel et al eine Einbauhemmung des 3 H-Thymidins bewirkt, die zumindest halb so groß ist wie die Einbauhemmung durch Methotrexat ^(R).
2. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest Teile, insbesondere Wurzelteile, einer Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. flüssig extrahiert und von den Gerbstoffen weitgehend befreit werden, worauf der den Wirkstoff enthaltende Extrakt in eine physiologisch unbedenkliche Form gebracht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest die resorbierbaren Gerbstoffe so weit reduziert werden, daß einerseits ihre Aktivität physiologisch unbedenklich ist, andererseits sie jedoch noch eine allfällige Funktion als Träger- und/oder Schutzsubstanz erfüllen können.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe die Teile der Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. alkalisiert und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel, beispielsweise Äthylacetat, extrahiert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe die Teile der Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. alkoholisch extrahiert werden, worauf der Extrakt mit Bleiacetatatlösung ver-
5 setzt und der entstehende Niederschlag entfernt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Teile der Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. wässrig extrahiert und der Extrakt zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe mit Hilfe eines Spaltpilzes einer fermentativen Umwandlung unterzogen werden, worauf der ent-
10 stehende Niederschlag entfernt wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest Teile, insbesondere Wurzelteile, einer Uncaria tomentosa (WILLD.) DC. zur zumindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe mit Hilfe eines Spaltpilzes einer fermentativen Umwandlung unterzogen und anschließend flüssig extrahiert werden, worauf der den Wirkstoff enthaltende Extrakt in eine physiologisch unbekannte Form gebracht wird.
15

20 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die fermentative Umwandlung in saurem Milieu, vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 2 und 5, erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die fermentative Umwandlung in Anwesenheit von verdünnter Zitronensäure erfolgt.
25

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Spaltpilz ein Vertreter der Gattung Trichoderma aus der Gruppe der imperfekten Ascomyceten verwendet wird.

30 11. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest Teile, insbesondere



- 20 -

Wurzelteile einer *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC., zur zu-
mindest weitgehenden Entfernung der Gerbstoffe bei einer
Temperatur, die kanpp unter der Verkohlungstemperatur des
Holzes liegt, getrocknet und anschließend flüssig extra-
5 hiert werden, worauf der den Wirkstoff enthaltende Extrakt
in eine physiologisch unbedenkliche Form gebracht wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß
die Trocknung bei 130 - 150 Grad C während eines Zeitraumes
von etwa 45 Minuten erfolgt.

10 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 11, dadurch ge-
kennzeichnet, daß der von den Gerbstoffen weitgehend be-
freite Extrakt zur Anreicherung des Wirkstoffes konzen-
triert, vorzugsweise eingetrocknet und vorzugsweise im
Extrahens wieder gelöst wird.

15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 13, dadurch ge-
kennzeichnet, daß der den Wirkstoff enthaltende Extrakt
gefriergetrocknet und die Trockensubstanz in einer physio-
logischen Flüssigkeit, beispielsweise Wasser, gelöst wird.

20 15. Nach dem Verfahren nach Anspruch 2, 7 und 10 herge-
stelltes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Wurzel-
teilen einer *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. mit dunkelroter
Bastfärbung gewonnen ist.

25 16. Nach dem Verfahren nach Anspruch 2, 7 oder 10 herge-
stelltes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Wurzel-
teilen einer *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. mit gelbbrauner
Bastfärbung gewonnen ist.

17. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1 - 16
als Zytostatikum.

30 18. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1 - 16
als Kontrazeptivum.



- 21 -

19. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1 - 16
zur Entzündungshemmung.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. EPCT/EP 81/00159

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. ³ : A 61 K 35/78; C 07 G 17/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁴

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. ³	A 61 K 35/78; C 07 G 17/00; C 07 G 5/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁶

Category ¹⁵	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
	Chemical Abstracts, Vol. 82, number 21, 26 May 1975, columbus , Ohio (US) S.R.Hemingway et al. : 'Alkaloids from S, American species of Uncaria (Rubiaceae)' see page 274, abstract 135680k J.Pharm. Pharmacol. 1974, 26 . Supp. 113P	1-16
	DE, B, 1184897, published on 7 January 1965, see the claim , Meiji Seika Kaisha Ltd.	1-16 .../...

• Special categories of cited documents: ¹⁹

- "A" document defining the general state of the art
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed

"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search ²⁰

11 January 1982 (11.01.82)

Date of Mailing of this International Search Report ²¹

18 January 1982 (18.01.82)

International Searching Authority ²²

European Patent Office

Signature of Authorized Officer ²³

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹⁰

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers 17-19, because they relate to subject matter ¹¹ not required to be searched by this Authority, namely:

Process for the surgical or therapeutic treatment of a human or animal body and diagnostic method

2. Claim numbers _____, because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out ¹², specifically:

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ¹³

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims of the International application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

P /EP 81/00159

I. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ³

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder sowohl nach der nationalen Klassifikation als auch nach der IPC

Int.CI. ³: A 61 K 35/78; C 07 G 17/00

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff ⁴

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.CI. ³	A 61 K 35/78; C 07 G 17/00; C 07 G 5/00

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁵III. ALS BEDEUTSAM ANZUSEHENDE VERÖFFENTLICHUNGEN ¹⁴

Art +	Kennzeichnung der Veröffentlichung, ¹⁶ mit Angabe, soweit erforderlich, der in Betracht kommenden Teile ¹⁷	Betr. Anspruch Nr. ¹⁸
	Chemical Abstracts, Band 82, Nummer 21, 26. Mai 1975, Columbus, Ohio (US) S.R.Hemingway et al.: "Alkaloids from S.American species of Uncaria (Rubiaceae)" siehe Seite 274, Zusammenfassung 135680k, J.Pharm. Pharmacol. 1974, 26. Supp. 113P --	1-16
	DE, B, 1184897, veröffentlicht am 7. Januar 1965, siehe die Patentansprüche, Meiji Seika Kaisha Ltd. -----	1-16 %

+ Besondere Arten von angegebenen Veröffentlichungen: ¹⁵

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert
- "E" frühere Veröffentlichung, die erst am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist
- "L" Veröffentlichung, die aus anderen als den bei den übrigen Arten genannten Gründen angegeben ist
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

- "P" Veröffentlichung, die vor dem Anmeldedatum, aber am oder nach dem beanspruchten Prioritätsdatum erschienen ist
- "T" Spätere Veröffentlichung die am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben wurde
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des tatsächlichen Abschlusses der internationalen Recherche ²

11. Januar 1982

Absendecatum des internationalen Recherchenberichts ²

18. Januar 1982

Internationale Recherchenbehörde ¹
EUROPÄISCHES PATENTAMTUnterschrift des bevoilsmächtigten Bediensteten ²⁰

G.L.M. Kruydenberg

FORTSETZUNG DER ANGABEN VOM ZWEITEN BLATT

V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN 10

Dieser internationale Recherchenbericht geht gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a aus folgenden Gründen auf einige Ansprüche nicht ein:

1. Ansprüche Nr. 17-19, weil sie sich auf Gebiete beziehen, in bezug auf die diese Behörde nicht zur Durchführung einer Recherche verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. _____, weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kann 131, insbesondere

VI. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG 11)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, also auf die folgenden Ansprüche:

3. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die zuerst in den Ansprüchen erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.